

اثر اسیدهای آلی و فرمالدئید بر مرفولوژی روده جوجه‌های گوشتی و کاهش آلودگی سالمونلایی دان

بهرام قدیانلو، شعبان رحیمی*، محمد امیر کریمی ترشیزی

گروه پرورش و تولید طیور، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۲۰ آبان ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۶ مهر ماه ۱۳۸۷)

چکیده

کاهش آلودگی میکروبی خوراک طیور می‌تواند به کاهش آلودگی میکروبی محصولات طیور در کشتارگاه کمک نماید. در این پژوهش اثر مخلوط تجاری اسیدهای آلی (سالکیل و فورمایسین)، فرمالین و گاز فرمالدئید بر مخاط روده جوجه‌های گوشتی، فلور میکروبی دستگاه گوارش و کاهش آلودگی سالمونلایی دان مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه گوشتی (راس ۳۰۸)، در ۵ گروه با ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ قطعه جوجه تا ۴۲ روزگی پرورش یافتند. گروه اول به عنوان شاهد با جیره پایه بدون افزودنی خوراکی، گروه‌های دوم تا پنجم به ترتیب ۰/۲ درصد سالکیل، ۰/۲ درصد فرمالین، ۰/۱ درصد فورمایسین و گاز فرمالدئید ۱X در جیره پایه دریافت کردند. در مرحله اول تحقیق تأثیر ضد سالمونلایی تیمارهای آزمایشی در خوراک بررسی شد. در مرحله دوم اثر تیمارهای آزمایشی بر مرفولوژی روده جوجه‌های گوشتی مطالعه گردید. فرمالین در کوتاه‌ترین مدت سالمونلا انتریتیدیس افزوده شده به خوراک را از بین برد. انواع پرزهای برگه وزبانی (p < ۰/۰۱) در سن ۲۸ روزگی، پرزهای پل مانند (p < ۰/۰۵) در سن ۱۴ و ۴۲ روزگی و تعداد پرزها در میدان دید در سن ۲۸ (p < ۰/۰۱) و ۴۲ (p < ۰/۰۵) روزگی تحت تأثیر تیمارها قرار گرفتند. گروه‌های آزمایشی بر ارتفاع پرز (p < ۰/۰۱) در سن ۱۴ روزگی، عمق کریپت (p < ۰/۰۵) و نسبت ارتفاع به عرض پرز (p < ۰/۰۵) در سن ۲۸ روزگی تأثیر گذاشتند.

واژه‌های کلیدی: جوجه گوشتی، اسیدهای آلی، فرمالدئید، سالمونلا انتریتیدیس، ضد عفونی خوراک.

بیماری‌زا گردد. کارایی هضم در طیور بستگی به میکروارگانیزم‌هایی دارد که به طور طبیعی در دستگاه گوارش یافت می‌شوند. با مصرف آنتی بیوتیک‌ها، باکتری‌ها به آنها مقاوم شده و می‌توانند این مقاومت را از طریق ژنتیکی و پلاسمیدها به باکتری‌های نسل بعد انتقال دهند.

اسیدهای آلی از طریق کاهش pH خوراک طیور دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند و به علت کاهش ظرفیت بافری غذاها باعث کنترل جمعیت میکروبی روده می‌شوند. اسیدهای آلی به صورت تفکیک نشده از غشاء باکتری‌ها عبور می‌کنند. در داخل سلول باکتری، تفکیک شده و تولید یون‌های هیدروژن و بی‌کربنات می‌نمایند و با افزایش اسیدیته، سلول باکتری را مجبور می‌کنند تا برای توازن طبیعی اسیدیته، انرژی مصرف کند. از طرف دیگر یون-RCOO نیز موجب توقف یا کاهش سنتز DNA و پروتئین شده و در مجموع رشد باکتری کاهش می‌یابد. در سال‌های اخیر توجه روزافزونی به تأثیر اسیدهای آلی بر روی کارایی خوراک و عملکرد طیور شده است اما تأثیر افزایش عملکرد توسط اسیدهای آلی به صورتی که در خوک‌ها مشخص شده است، نبوده است. اسیدهای آلی تولید ترکیبات سمی باکتری‌ها را کاهش داده، باعث تغییر در مرفولوژی دیواره روده و کاهش کلنی باکتری‌های بیماری‌زای می‌شوند. بنابراین از تخریب و آسیب سلول‌های اپیتلیال دیواره روده جلوگیری می‌نمایند (۸). اسیدهای آلی مانند اسید پروپیونیک، اسید فرمیک و یا ترجیحا املاح آنها مانند پروپیونات آمونیوم، لوپروسیل و ترکیبات تجارتي نظیر سالکیل (Salkil) و فورمایسین (Formycine) با کاهش تولید ترکیبات سمی توسط باکتری‌ها باعث تغییر در مرفولوژی دیواره روده و کاهش تجمع پاتوژن‌ها در دیواره روده گردیده، بنابراین در پیشگیری از وارد آمدن آسیب به سلول‌های اپی

مقدمه

امروزه پرورش طیور به عنوان یکی از بزرگترین منابع تأمین پروتئین حیوانی جای خود را در جهان باز کرده است. صنعت طیور علاوه بر تأمین اسیدهای آمینه ضروری، از نظر اقتصادی نیز به دلیل بازگشت سریع سرمایه و بازده غذایی بالا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. سالمونلوز طیور یکی از بزرگترین مشکلات اقتصادی صنعت مرغداری در سطح بین‌المللی است که از نقطه نظر اقتصادی، از مسائل عمده این صنعت به شمار می‌رود. همچنین دارا بودن منابع عفونت متعدد، گسترده‌گی میزبان‌ها، سروتیپ‌ها، وجود حاملین طبیعی، پخش مدفوع و آلودگی گسترده محیط، سبب گردیده که این بیماری دارای اپیدمیولوژی پیچیده‌ای باشد (۳). آنتی بیوتیک‌ها به میزان زیادی برای پیشگیری و درمان بیماری در پرندگان مصرف شده‌اند. آنتی بیوتیک‌ها همچنین سال‌های زیادی در تغذیه طیور به عنوان افزودنی معمولی در خوراک برای افزایش رشد و بهبود عملکرد گله، بکار رفته‌اند. آنتی بیوتیک‌ها اولین بار توسط Moor و همکاران در سال ۱۹۴۶ در خوراک جوجه‌های گوشتی جهت افزایش رشد آنها به کار برده شد. آنتی بیوتیک‌ها سبب افزایش وزن گیری جوجه‌های گوشتی، بهبود ضریب تبدیل خوراک، کاهش مرگ و میر به همراه کاهش جمعیت میکروبی مضر دستگاه گوارش و افزایش مواد غذایی قابل دسترس می‌شوند (۸). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها معایبی به همراه دارد. استفاده از این مواد موجب افزایش اندکی در pH محتویات روده شده، تولید اسیدهای چرب فرار را کاهش می‌دهد و در ضمن فلور طبیعی روده را نیز تغییر می‌دهد که ممکن است سبب افزایش حساسیت حیوان نسبت به برخی عوامل



که ردیف‌هایی از پرزها در کنار یکدیگر و متصل به هم جدا شوند. سپس نمونه‌های جدا شده با پنس برداشته شده، بر روی لام قرار داده شدند. پس از ریختن یک قطره گلیسرین بر روی نمونه‌ها، با لام روی آنها پوشانده شد. لام تهیه شده به روش فوق در زیر میکروسکوپ قرار گرفته و در زیر یکی از عدسی‌های چشمی میکروسکوپ، گراتیکول مدرج نصب گردید و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر، ارتفاع و عرض پرزها و عمق کریپت‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس طول پرز (از رأس پرز تا قاعده آن)، عرض پرز (عرض قاعده پرز) و عمق کریپت (از قاعده پرز تا انتهای غدد) با انطباق گراتیکول به ناحیه مورد نظر اندازه‌گیری شد. در هر نمونه حدود ۱۵ پرز اندازه‌گیری شدند و میانگین آنها برای تجزیه آماری استفاده گردید.

بررسی تعداد انواع پرزهای روده باریک: از هر نمونه تثبیت شده، قطعاتی به ابعاد ۲ سانتیمتر بریده شد و در محلول رنگ آمیزی P. A. S. به مدت کافی (حدود ۱ دقیقه) رنگ آمیزی و سپس رنگ اضافی با آب مقطر شستشو داده شد. نمونه‌ها بر روی پلیت‌های حاوی پارافین جامد به وسیله سوزن مهار گردید. شمارش در ۳ ناحیه انجام شد و برای دقت بیشتر، شمارش، ردیف به ردیف صورت گرفت. پرزها توسط یک سوزن باریک کنار زده می‌شدند تا اینکه نوع آنها کاملاً مشخص گردد. برای بررسی نمونه‌ها از بینیکولار با درشت‌نمایی ۲۵ برابر استفاده شد. تعداد ۱۰۰ پرز در هر ناحیه برای تعیین فراوانی نسبی انواع پرزهای زبانی، برگی و پیل مانند شمارش شد. سپس میانگین تعداد هر یک از پرزها محاسبه گردید. تعداد پرزها در میدان دید نیز برای هر نمونه در سه ناحیه تعیین و میانگین آن ثبت گردید.

بررسی تأثیر گروه‌های آزمایشی بر کاهش آلودگی تجربی خوراک با سالمونلا انتریتیدیس: در قسمت اول آزمایش ۱۸ سل ۵۰۰ میلی لیتری در نظر گرفته شد. به داخل هر کدام از آنها ۱۰۰ گرم دان رشد، انتقال داده شد. سپس ارلن‌ها در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت استریل شدند. سپس آنها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری کرده تا اینکه رطوبت اضافی آنها خارج گردید. یکی از ارلن‌ها به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و در سه ارلن دیگر به ترتیب ۰/۲ درصد سالکین، ۰/۲ درصد فرمالین و ۰/۱ درصد فورمایسین افزوده گردید. پنجمین ارلن با گاز فرمالدئید IX دود داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، با استفاده از کشت شبانه حاوی 10^7 cfu در ۹/۶ میلی لیتر، به هر کدام از ارلن‌ها ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری سالمونلا انتریتیدیس، اسپری گردید و کاملاً مخلوط شد. در قسمت دوم، تمام مراحل فوق انجام شد بجز آنکه ابتدا سوسپانسیون باکتری به خوراک اضافه گردید (10^8 cfu در ۲/۶ میلی لیتر) و سپس بعد از ۲۴ ساعت هر کدام از تیمارها به بالن‌های حاوی خوراک اضافه شدند. برای شمارش تعداد باکتری‌های سالمونلا در زمان‌های صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۰ ساعت پس از آلوده نمودن، نمونه‌هایی به وزن ۲ گرم تهیه شد. همچنین سری رقت با فاکتور رقت ۰/۲ تهیه و با روش میلز و میزرا، بر روی پلیت دارای محیط کشت سالمونلا - شینگلا آگار کشت شد (۱۵). پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و شرایط هوازی از پرکنه‌های سالمونلا شمارش انجام شد. با در نظر گرفتن تعداد پرکنه، فاکتور

تلیال مؤثر هستند. فرمالدئید به عنوان یک افزودنی ضد میکروبی، به خصوص برای حذف سالمونلا در خوراک شناخته شده است. از فرمالدئید می‌توان به عنوان محافظت کننده خوراک حیوانات استفاده نمود. بر اساس گزارش‌های Bernardo و همکاران در سال ۱۹۸۹، به منظور از بین بردن میکروارگانسیم سالمونلا در جیره غذایی طیور از بخار فرمالدئید توأم با مخلوط نمودن خوراک به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شده است (۱). با انجام این تحقیق، نحوه تأثیر اسیدهای آلی و فرمالدئید بر مرفولوژی روده جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه یکروزه گوشتی سویه راس ۳۰۸ از شرکت جوجه کشی خریداری شد. جوجه‌های نر و ماده به طور تصادفی در ۵ گروه با ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ قطعه جوجه تقسیم بندی شده و به ۲۰ پن بطور جداگانه انتقال داده شدند. در ابتدای دوره پرورش، جوجه‌ها وزن شده و میانگین وزن آنها محاسبه گردید. در پایان هر هفته نیز جوجه‌های هر گروه آزمایشی وزن کشی شدند و نتایج به صورت میانگین یادداشت می‌شد. وزن کشی جوجه‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ± 10 گرم انجام می‌گردید.

تهیه نمونه برای بررسی‌های مورفولوژیکی: در سنین ۱۴، ۲۸ و ۴۲ روزگی ۴ قطعه جوجه از هر گروه به طور تصادفی انتخاب شدند. نمونه گیری و آماده سازی نمونه‌ها طبق روش Teshfam و همکاران در سال ۲۰۰۵، (۱۱) به ترتیب ذیل انجام شد. پس از کشتن پرندها نمونه‌های روده از سه ناحیه ابتدایی، میانی و انتهایی روده کوچک تهیه شدند. نمونه‌های روده که شامل قطعاتی به طول ۸ سانتیمتر بودند، به وسیله سرنگ، با محلول P. B. S. شستشو داده شدند. از نخ دارای پلاک کددار، که شماره هر نمونه روی آن نوشته شده بود، برای بستن انتهای هر یک از نمونه‌ها استفاده شد. سپس توسط سرنگ دیگری محلول کلارک از طرف دیگر نمونه به داخل آن تزریق شد تا اینکه کاملاً پر شود. سپس به وسیله نخ دیگری محل تزریق محلول، مسدود گردید. نمونه‌های تهیه شده در داخل ظرفی که حاوی محلول کلارک بود به مدت یک ساعت نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها از محلول خارج شده و از انتهای بدون شماره بریده شدند و یک برش طولی در محل اتصال مزاتر، به نمونه‌ها داده شد. نمونه‌ها تا زمان بررسی در آزمایشگاه در محلول الکل ۵۰ درصد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری ابعاد پرزها و عمق کریپت‌ها: نمونه‌ها از داخل محلول الکل ۵۰ درصد بیرون آورده شده و قطعاتی به طول ۲ سانتیمتر جدا گردید. لایه ماهیچه‌ای با یک چاقوی ظریف مخصوص جراحی چشم، از لایه مخاطی جدا گردید. لایه مخاطی به دست آمده به داخل محلول رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف P. A. S. انداخته شد تا اینکه به مدت کافی (حدود ۱ دقیقه) در این محلول باقی بماند. نمونه بعد از بیرون آوردن از محلول رنگ، با سرم فیزیولوژی شستشو داده شده سپس روی پارافین جامد درون ظرف پتری توسط سوزن، مهار شدند. در زیر بینیکولار با بزرگ‌نمایی ۲۵، توسط چاقوی مخصوص جراحی چشم، برش‌هایی در فواصل بین پرزها و در جهت طولی آنها داده شد به نحوی



جدول ۳- تاثیر ضد عفونی کننده های دان و محل نمونه برداری بر ابعاد پرزها در ۴۲ روزگی. ns غیر معنی دار ($p > 0.05$)، × اختلاف معنی دار ($p < 0.05$)، ×× اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) SEM خطای معیار میانگین.

ابعاد پرزها (میلی متر)					
تیمار	عرض	ارتفاع	عمق کریپت	نسبت ارتفاع به عرض	نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت
شاهد	۰/۸۶۵	۰/۸۹۹	۰/۲۱۴	۱/۰۴۱	۴/۱۵۳
فورمایسین	۰/۸۲۲	۰/۹۰۷	۰/۲۰۲	۱/۰۹۸	۴/۴۳۲
گاز فرمالدئید	۰/۸۵۰	۰/۸۹۲	۰/۲۱۸	۱/۰۴۷	۴/۰۸۹
فرمالین	۰/۸۶۴	۰/۸۳۸	۰/۲۰۳	۰/۹۶۳	۴/۱۱۹
سالکیل	۰/۷۵۹	۰/۷۴۰	۰/۲۰۲	۰/۹۸۵	۳/۶۳۳
احتمال ns	ns	ns	ns	ns	ns
محل نمونه برداری					
دئودنوم	۰/۹۳۵ ^a	۰/۹۹۵ ^a	۰/۲۲۲ ^a	۱/۰۶۲	۴/۴۶۸ ^a
ژژنوم	۰/۸۳۴ ^b	۰/۸۶۰ ^a	۰/۲۱۰ ^a	۱/۰۳۴	۴/۱۰۱ ^{ab}
ایلنوم	۰/۷۲۷ ^c	۰/۷۱۱ ^b	۰/۱۹۲ ^b	۰/۹۸۵	۳/۷۸۶ ^b
احتمال *	ns	*	*	*	**
احتمال					
تیمار × محل	ns	ns	*	ns	ns
SEM	۰/۱۷	۰/۲۵	۰/۰۳	۰/۲۰	۰/۷۰

جدول ۴- تاثیر ضد عفونی کننده های دان بر درصد فراوانی انواع پرزهای روده کوچک در سن ۱۴ روزگی. ns غیر معنی دار ($p > 0.05$)، × اختلاف معنی دار ($p < 0.05$)، ×× اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) SEM خطای معیار میانگین.

تیمار	تعداد پرز در میدان دید	درصد انواع پرزها			پیمایشی
		برگی شکل	زبانی شکل	پل مانند	
شاهد	۱۴/۸	۲۱/۰۸	۷۲/۶۷	۶/۲۴ ^b	۰/۲۱
فورمایسین	۱۴/۳۸	۱۶/۶۲	۷۸/۲۸	۵/۰۸ ^b	۰/۵۱
گاز فرمالدئید	۱۴/۲۹	۲۳/۶۸	۶۶/۸۳	۹/۴۸ ^a	۰/۶۴
فرمالین	۱۴/۵۸	۱۹/۸۹	۷۵/۳۲	۴/۸۰ ^b	۰/۱۹
سالکیل	۱۴/۷۸	۲۵/۲۲	۶۹/۵۸	۵/۲۰ ^b	۰
احتمال ns	ns	ns	ns	*	ns
محل نمونه برداری					
دئودنوم	۱۳/۷۸ ^b	۱۳/۸۳ ^b	۷۹/۳۳	۵/۶۵	۰/۱
ژژنوم	۱۳/۷۹ ^b	۲۴/۷۶ ^a	۶۹/۲۲	۶/۰۱	۰/۳
ایلنوم	۱۶/۴۱ ^a	۲۵/۳۰ ^a	۶۹/۰۵	۶/۸۴	۰/۶
احتمال *	*	*	*	ns	ns
احتمال					
تیمار × محل	ns	ns	*	ns	ns
SEM	۰/۴۲۴	۰/۰۲۵	۰/۰۲۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱

نتایج

در جد اول ۲، ۱ و ۳ ابعاد پرزها، عمق کریپت، نسبت ارتفاع پرز به عرض پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در نواحی مختلف روده کوچک، نشان داده شده است.

همان طور که مشاهده می شود در سنین مختلف هر چه از قسمت های ابتدایی روده باریک به سمت انتهای روده نزدیک می شویم، ارتفاع پرزها کاهش

جدول ۱- تاثیر ضد عفونی کننده های دان و محل نمونه برداری بر ابعاد پرزها در ۱۴ روزگی. ns غیر معنی دار ($p > 0.05$)، × اختلاف معنی دار ($p < 0.05$)، ×× اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) SEM خطای معیار میانگین.

ابعاد پرزها (میلی متر)					
تیمار	عرض	ارتفاع	عمق کریپت	نسبت ارتفاع به عرض	نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت
شاهد	۰/۸۰۶	۰/۸۷۴	۰/۱۵۱ ^a	۱/۰۷۰ ^{ab}	۵/۷۱۲
فورمایسین	۰/۷۱۷	۰/۸۵۲	۰/۱۳۴ ^b	۱/۱۸۳ ^a	۶/۳۲۹
گاز فرمالدئید	۰/۷۲۴	۰/۷۶۷	۰/۱۳۷ ^b	۱/۰۴۶ ^{ab}	۵/۵۱۳
فرمالین	۰/۷۱۶	۰/۷۱۱	۰/۱۳۲ ^b	۰/۹۸۰ ^b	۵/۳۱۲
سالکیل	۰/۷۳۱	۰/۸۰۵	۰/۱۳۱ ^b	۰/۱۱۷ ^{ab}	۶/۰۸۱
احتمال ns	ns	*	*	*	ns
محل نمونه برداری					
دئودنوم	۰/۷۷۲	۰/۸۵۴	۰/۱۳۹	۱/۰۹۸	۶/۰۴۳
ژژنوم	۰/۷۵۷	۰/۸۴۸	۰/۱۳۹	۱/۱۳۲	۶/۰۲۱
ایلنوم	۰/۶۸۹	۰/۷۰۳	۰/۱۳۲	۱/۰۱۸	۵/۳۰۴
احتمال ns	ns	ns	ns	ns	ns
احتمال					
تیمار × محل	ns	ns	*	ns	ns
SEM	۰/۱۶	۰/۲۴	۰/۱۹	۰/۲۲	۱/۳۱

جدول ۲- تاثیر ضد عفونی کننده های دان و محل نمونه برداری بر ابعاد پرزها در ۲۸ روزگی. ns غیر معنی دار ($p > 0.05$)، × اختلاف معنی دار ($p < 0.01$)، ×× اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) SEM خطای معیار میانگین.

ابعاد پرزها (میلی متر)					
تیمار	عرض	ارتفاع	عمق کریپت	نسبت ارتفاع به عرض	نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت
شاهد	۰/۵۴۲	۰/۶۸۰ ^{ab}	۰/۱۰۱	۱/۲۰۳ ^b	۶/۴۷۴ ^b
فورمایسین	۰/۵۶۲	۰/۸۱۳ ^a	۰/۱۰۲	۱/۴۶۶ ^a	۷/۹۶۴ ^a
گاز فرمالدئید	۰/۵۶۱	۰/۷۴۳ ^{ab}	۰/۱۰۴	۱/۲۹۶ ^{ab}	۷/۰۸۳ ^{ab}
فرمالین	۰/۵۶۳	۰/۷۳۷ ^{ab}	۰/۱۰۶	۱/۲۸۳ ^{ab}	۶/۸۸۴ ^{ab}
سالکیل	۰/۵۱۴	۰/۶۳۰ ^b	۰/۱۰۱	۱/۲۲۴ ^b	۶/۲۱۷ ^b
احتمال ns	ns	**	**	ns	**
محل نمونه برداری					
دئودنوم	۰/۶۵ ^a	۰/۹۹ ^a	۰/۱۱ ^a	۱/۵۲ ^a	۹/۰۳ ^a
ژژنوم	۰/۵۶ ^b	۰/۷۷ ^b	۰/۱۱ ^a	۱/۳۰ ^b	۶/۷۷ ^b
ایلنوم	۰/۴۳ ^c	۰/۴۶ ^c	۰/۰۹ ^b	۱/۰۶ ^c	۴/۹۶ ^c
احتمال **	**	**	**	**	**
احتمال					
تیمار × محل	ns	ns	ns	ns	ns
SEM	۰/۱۲	۰/۲۷	۰/۰۱۴	۰/۳۲	۲/۲۲

رقت و مقدار کشت شده ($20 \mu l$) تعداد باکتری در هر گرم دان محاسبه شد.

تجزیه آماری: تجزیه و تحلیل اطلاعات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار شامل شاهد، فورمایسین، فرمالین، گاز فرمالدئید و سالکیل تجزیه و تحلیل شدند و در نهایت هر یک از تیمارها با گروه شاهد مقایسه گردید. داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. به منظور مقایسه میانگین ها، از آزمون دانکن استفاده شد.



جدول ۷- تاثیر ضد عفونی کننده های دان بر کاهش باکتری سالمونلا انتریتیدیس در آزمایش ابل. abc مقادیر هر ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.01$). SEM خطای معیار میانگین.

زمان (ساعت)	۰	۲	۸	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
نوع جیره	(log cfu/g)								
شاهد	۶/۲۸ ^a	۵/۶۰ ^a	۵/۳۸ ^a	۴/۸۸ ^a	۴/۴۳ ^a	۳/۳۶ ^a	۳/۱۱ ^a	۲/۷۰ ^a	۰
گاز فرمالدئید	۶/۱۲ ^a	۵/۳۵ ^a	۵/۰۴ ^a	۴/۳۶ ^a	۳/۷۳ ^b	۰	۰	۰	۰
۰/۱ درصد فورمالیسین	۴/۲۳ ^c	۳/۵۳ ^c	۲/۸۸ ^c	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰/۲ درصد سالکیل	۵/۳۴ ^b	۴/۸۴ ^b	۴/۴۹ ^b	۴/۲۸ ^b	۳/۶۰ ^b	۲/۷۰ ^b	۰	۰	۰
۰/۲ درصد فرمالین	۵/۳۴ ^b	۴/۸۴ ^b	۴/۴۹ ^b	۴/۲۸ ^b	۳/۶۰ ^b	۲/۷۰ ^b	۰	۰	۰
SEM	۰/۰۶	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۲۲	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۰۶	۰/۰۶	۰

جدول ۸- تاثیر ضد عفونی کننده های دان بر کاهش باکتری سالمونلا انتریتیدیس در آزمایش دوم. abc مقادیر هر ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.01$). SEM خطای معیار میانگین.

زمان (ساعت)	۰	۲	۸	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
نوع جیره	(log cfu/g)								
شاهد	۵/۱۸ ^a	۴/۸۹ ^a	۴/۷۱ ^a	۴/۵۵ ^a	۴/۳۴ ^a	۳/۹۸ ^a	۳/۵۱ ^a	۲/۶۵ ^a	۰
گاز فرمالدئید	۴/۸۸ ^a	۴/۸۱ ^a	۴/۵۳ ^a	۴/۴۵ ^a	۴/۰۴ ^a	۳/۳۰ ^b	۲/۵۸ ^b	۰	۰
۰/۱ درصد فورمالیسین	۴/۸۶ ^a	۴/۱۱ ^b	۳/۸۸ ^b	۳/۸۸ ^b	۰	۰	۰	۰	۰
۰/۲ درصد سالکیل	۴/۹۵ ^a	۴/۸۴ ^a	۴/۶۵ ^a	۴/۴۷ ^a	۴/۲۰ ^a	۳/۹۵ ^a	۳/۴۰ ^a	۲/۴۰ ^a	۰
۰/۲ درصد فرمالین	۴/۹۵ ^a	۴/۸۴ ^a	۴/۶۵ ^a	۴/۴۷ ^a	۴/۲۰ ^a	۳/۹۵ ^a	۳/۴۰ ^a	۲/۴۰ ^a	۰
SEM	۰/۱۰	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۸	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۲	۰

کاهش نشان می دهد. اثر تیمار در سن ۱۴ روزگی بر ارتفاع پرز، نسبت ارتفاع به عرض و نسبت اتفاع به عمق کریبت معنی دار می باشد ($p < 0.01$). تأثیر محل نمونه برداری بر ابعاد پرزها و عمق کریبت و نسبت بین آنها در سن ۱۴ و ۴۲ روزگی معنی دار مشاهده می شود ($p < 0.01$). اثر متقابل تیمار و محل بر عمق کریبت در سن ۲۸ و ۴۲ روزگی معنی دار شده است ($p < 0.05$).

در جداول ۴، ۵ و ۶ درصد فراوانی انواع پرزهای روده باریک در بخش های مختلف آن، همچنین میانگین تعداد پرزها در میدان دید نشان داده شده است. مشاهده می شود که در سنین مختلف، گروه های آزمایشی اثرات متفاوتی روی پرزها در بخش های مختلف روده باریک دارند.

در سن ۲۸ روزگی، تیمارها بر تعداد پرزهای زبانی و برگی تأثیر معنی داری داشته اند ($p < 0.01$). اما در سنین ۱۴ و ۴۲ روزگی، اثر معنی داری نداشته اند. پرزهای پیچشی در گروه های مختلف سنی، تحت تأثیر تیمار قرار نگرفتند. در سنین ۱۴ و ۲۸ روزگی پرزهای زبانی در گروه هایی که با خوراک حاوی فرمالین و فورمالیسین تغذیه شده اند، در مقایسه با دیگر گروه های آزمایشی و نیز گروه شاهد افزایش بیشتری نشان می دهند. عکس این موضوع برای پرزهای برگی شکل صادق است. به طوری که کمترین تعداد پرزهای برگی در گروه فورمالیسین و کمترین پرزهای پل مانند در گروه فرمالین دیده می شود. گروه آزمایشی گاز فرمالدئید کمترین تعداد پرزهای زبانی را در سنین ۱۴ و ۴۲ روزگی در مقایسه با گروه شاهد و دیگر گروه های آزمایشی نشان می دهد. در گروه آزمایشی سالکیل در ۱۴ روزگی، درصد پرزهای پیچیده، صفر می باشد.

جدول ۵- تاثیر ضد عفونی کننده های دان بر درصد فراوانی انواع پرزهای روده کوچک در سن ۲۸ روزگی. ns غیر معنی دار ($p > 0.05$)، * اختلاف معنی دار ($p < 0.05$)، ** اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) SEM خطای معیار میانگین.

تیمار	درصد انواع پرزها				
	تعداد پرز در میدان دید	برگی شکل	زبانی شکل	پل مانند	پیچشی
شاهد	۱۴/۲۵ ^{ab}	۳۵/۰۹ ^a	۵۷/۸۶ ^b	۷/۰۵	۱۲/۲۳
فورمالیسین	۱۲/۸۳ ^b	۲۳/۴۲ ^{ab}	۶۹/۱۴ ^{ab}	۷/۴۲	۱/۱۶
گاز فرمالدئید	۱۳/۵۸ ^{ab}	۳۲/۵۱ ^{ab}	۶۱/۶۰ ^{ab}	۵/۹۰	۰/۳۷
فرمالین	۱۴/۷۳ ^a	۲۰/۳۸ ^b	۷۵/۲۸ ^a	۴/۳۳	۰/۴۲
سالکیل	۱۳/۶۹ ^{ab}	۳۳/۹۶ ^a	۶۰/۱۰ ^b	۵/۹۲	۰/۷۸
احتمال	**	**	**	ns	ns
محل نمونه برداری					
دئودنوم	۱۳/۱۰ ^b	۱۷/۹۱ ^c	۷۷/۸۹ ^a	۴/۲۰ ^b	۰/۲۰ ^b
ژژنوم	۱۲/۴۹ ^b	۳۹/۷۶ ^a	۵۲/۹۵ ^c	۶/۹۰ ^a	۱/۲۳ ^{ab}
ایلئوم	۱۵/۸۶ ^a	۲۹/۵۵ ^b	۶۳/۵۵ ^b	۷/۱۱ ^a	۰/۹۳ ^a
احتمال	*	**	**	*	*
اثر					
تیمار × محل	ns	ns	ns	ns	ns
SEM	۰/۳۲۹	۰/۲۲	۰/۲۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲

جدول ۶- تاثیر ضد عفونی کننده های دان بر درصد فراوانی انواع پرزهای روده کوچک در سن ۴۲ روزگی. ns غیر معنی دار ($p > 0.05$)، * اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) SEM خطای معیار میانگین.

تیمار	درصد انواع پرزها				
	تعداد پرز در میدان دید	برگی شکل	زبانی شکل	پل مانند	پیچشی
شاهد	۱۳/۶۳ ^a	۳۵/۵۳	۵۶/۹۳	۷/۵۴ ^b	۰/۵۷
فورمالیسین	۱۳/۱۶ ^{ab}	۴۱/۱۰	۴۹/۱۳	۹/۷۵ ^{ab}	۱/۳۵
گاز فرمالدئید	۱۲/۲۴ ^b	۴۳/۸۹	۴۳/۰۸	۱۳/۰۱ ^a	۱/۲۶
فرمالین	۱۳/۰۳ ^{ab}	۳۶/۹۴	۵۴/۱۴	۸/۹۳ ^{ab}	۰/۵۴
سالکیل	۱۲/۵۱ ^{ab}	۳۹/۹۵	۵۱/۱۵	۸/۹۰ ^{ab}	۰/۵۸
احتمال	*	ns	ns	*	ns
محل نمونه برداری					
دئودنوم	۱۲/۰۵ ^b	۲۹/۳۴ ^b	۶۳/۵۳ ^a	۷/۱۵ ^b	۰/۴۲
ژژنوم	۱۳/۳۷ ^b	۴۶/۹۸ ^a	۴۳/۸۲ ^b	۹/۲۱ ^{ab}	۱/۱۷
ایلئوم	۱۳/۸۹ ^a	۴۲/۱۴ ^a	۴۵/۳۲ ^b	۱۲/۵۳ ^a	۰/۹۹
احتمال	*	*	*	*	ns
اثر					
تیمار × محل	ns	SEM	ns	ns	ns

می یابد که این کاهش در سنین ۱۴ و ۴۲ روزگی معنی دار می باشد (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.05$). فورمالیسین در سن ۱۴ روزگی تأثیر معنی داری بر ارتفاع پرز، نسبت ارتفاع به عرض و نسبت ارتفاع به عمق ($p < 0.01$) در مقایسه با گروه شاهد نشان می دهد. اما در سنین بالاتر تأثیر مهمی نداشته است. مشاهده می شود که تیمارهای آزمایشی در سن ۲۸ و ۴۲ روزگی، تأثیر معنی داری بر ارتفاع و عرض پرزها ندارند ($p > 0.05$). نتایج حاصل از این آزمایش نشان می دهد که عرض پرزها و عمق کریبت ها از ابتدای روده کوچک به سمت انتهای آن در تمام سنین



انتروسیت‌های بیشتری است) (۲). با توجه به اینکه در ابتدای روده باریک طول پرزها و عمق کریپت‌ها بیشتر می‌باشد و از ابتدای روده باریک به سمت انتهای روده، طول پرز، عمق کریپت و نسبت طول پرز به عمق کریپت کاهش می‌یابد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بخش‌های ابتدایی روده باریک، کریپت‌های عمیق‌تری دارند که با تولید پرز بیشتر امکان فعالیت هضمی و جذب مواد مغذی به شکل مؤثری مهیا می‌شود (Teshfam و همکاران در سال ۲۰۰۵). همچنین این بخش از روده باریک با داشتن تعداد زیاد سلول‌های انتروسیت و توانایی جذب مواد مغذی در آنها و بیشترین فراوانی پرزهای زبانی و کمترین فراوانی پرزهای پل مانند، از نظر جذب مواد مغذی، فعال می‌باشد (۱۱). همانطور که در نتایج افزایش وزن مطرح شد، جوجه‌هایی که از جیره حاوی فورمایسین خورده بودند، وزن بیشتری داشتند. در این قسمت نیز مشاهده می‌شود که طول پرزها در گروه فورمایسین در کل دوره افزایش می‌یابد. به عقیده Teshfam و همکاران در سال ۲۰۰۵ هرگونه تغییر در طول پرز به معنی تغییر در جذب می‌باشد و افزایش طول پرز نیز باعث افزایش جذب مواد هضم شده می‌شود (۱۱). به نظر می‌رسد که فورمایسین از این طریق می‌تواند میزان جذب را افزایش دهد و علت افزایش وزن را نیز شاید بتوان با همین موضوع مرتبط دانست.

Van Leeuwen و همکاران در سال ۲۰۰۴ با شناسایی انواع پرزها در قسمت‌های مختلف روده، به این نتیجه رسیدند که پرزهای زبانی در دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم در مقایسه با پرزهای برگ، پل مانند و پیچیده بیشترین نسبت را به خود اختصاص داده‌اند (۱۲). Pourhasan در سال ۲۰۰۸ با به کار بردن سطوح مختلف سالکیل و تأثیر آن بر فراوانی انواع پرزها نشان داد که در میان انواع پرزها، پرزهای زبانی در بخش‌های ابتدایی، میانی و انتهایی روده باریک، بیشترین تعداد را تشکیل می‌دهند (۹). این نتایج با نتایج مشاهده شده در این آزمایش مطابقت دارند.

بیشترین تعداد پرزهای زبانی در گروه آزمایشی فرمالین و فورمایسین در سن ۱۴ و ۲۸ روزگی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده می‌شود. همچنین در گروه آزمایشی فرمالین نسبت به سایر تیمارها، کمترین تعداد پرزهای پل مانند در سن ۱۴ و ۲۸ روزگی و نیز تعداد پرزهای پیچشی کمتری در مقایسه با گروه شاهد در کل دوره دیده می‌شود. پرزهای پل مانند از اتصال دو یا چند پرز برگ و زبانی حاصل می‌شوند که نتیجه تشکیل آنها کاهش سطح فعال جذب روده‌ها است. با توجه به اینکه پرزهای پیچیده از بهم پیوستن تعداد زیادی از پرزهای زبانی و برگ به وجود می‌آیند و نسبت به پرزهای زبانی و برگ آزاد سطح جذب کمتری دارند، بنابراین به نظر می‌رسد که گروه آزمایشی فرمالین، در کاهش این نوع پرزها مؤثر بوده است.

در آزمایش‌های انجام شده، بین گروه‌های آزمایشی از نظر کاهش تعداد سالمونلا انتریتیدیس در طول زمان‌های مختلف، اختلاف مشاهده می‌شود. در این آزمایش فرمالین توانست در کوتاه‌ترین زمان، آلودگی سالمونلاراز بین ببرد. در بین تیمارهای آزمایشی، سالکیل تأثیر کمتری در کاهش آلودگی میکروبی خوراک داشته است.

در آزمایش Kazerani و KhanNazer در سال ۲۰۰۱، از مقادیر مختلف

اثر محل نمونه برداری بر تعداد پرز در میدان دید در سنین مختلف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$). مشاهده می‌شود که محل نمونه برداری بر فراوانی انواع پرزها در سن ۱۴ روزگی تأثیر معنی‌داری نداشته است. اما در سن ۲۸ و ۴۲ روزگی، تأثیر معنی‌داری نشان داده است ($p < 0/01$ و $p < 0/05$). بیشترین تعداد پرزهای زبانی در سنین مختلف در ناحیه دئودنوم روده دیده می‌شود که در سنین ۲۸ و ۴۲ روزگی معنی‌دار است. اثر تیمار بر روی فراوانی پرزهای زبانی و برگ در سنین ۱۴ و ۴۲ روزگی معنی‌دار نمی‌باشد. اما در سن ۲۸ روزگی، این تأثیر معنی‌دار شده است ($p < 0/01$)

اثر محل نمونه برداری در سنین ۱۴ و ۴۲ روزگی روی تعداد پرز در میدان دید و پرزهای برگ، زبانی و پل مانند در سنین ۲۸ و ۴۲ روزگی معنی‌دار می‌باشد. اثر متقابل تیمار × محل بر فراوانی انواع پرزها بجز پرزهای برگ در سن ۱۴ روزگی، تأثیر مهمی را در سایر سنین نشان نمی‌دهد.

جداول ۷ و ۸ روند کاهش میزان سالمونلا را در خوراک، در زمان‌های مختلف نشان می‌دهند. همان‌طور که مشاهده می‌شود در هر دو حالت آزمایش، فرمالین اثر بسیار زیادی در کاهش مقدار سالمونلا در خوراک داشته است. همچنین روند کاهش بار میکروبی خوراک در زمان‌های مختلف توسط تیمارها در هر دو قسمت آزمایش مشابه می‌باشد. با این تفاوت که کاهش تعداد سالمونلا در حالتی که ابتدا تیمارهای آزمایشی به خوراک افزوده شده‌اند و سپس سالمونلا انتریتیدیس پس از سپری شدن ۲۴ ساعت به خوراک افزوده شده، سریع‌تر اتفاق افتاده است.

بحث

Van Leeuwen و همکاران در سال ۲۰۰۴ در آزمایشی نشان دادند که ارتفاع پرزها از ابتدای روده باریک به سمت انتهای آن کاهش می‌یابد (۱۲). در آزمایش Teshfam و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۱۱) نشان داده شد که طول پرزها از ابتدای روده تا رسیدن به ایلئوم کاهش می‌یابد. همچنین عرض پرز و عمق کریپت از قسمت‌های ابتدایی روده باریک به سمت انتهای روده کاهش نشان می‌دهد. بنا به گزارش Klasing در سال ۱۹۹۸ ضخامت لایه مخاطی روده، به تدریج در طول آن کاهش یافته و به دنبال آن طول پرزها و عمق کریپت‌ها کاهش می‌یابد (۶). نتایج به دست آمده از آزمایش‌های فوق با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد.

Ji و همکاران در سال ۲۰۰۱ دریافتند که در جوجه‌های گوشتی که از ۷ تا ۲۸ روزگی با جیره حاوی اسیدهای آلی تغذیه شده بودند، ارتفاع پرزها در ناحیه ژژنوم افزایش یافته بود در حالی که اسیدهای آلی بر سطح پرزها و عمق کریپت‌ها در ژژنوم و ایلئوم و نیز ارتفاع پرزها در ایلئوم تأثیر چندانی نداشته‌اند (۶).

بر اساس یافته‌های Teshfam و همکاران در سال ۲۰۰۵ کریپت‌های عمیق تر، دارای سلول‌های ترشحی بیشتری هستند (۱۱). به عقیده Hampson در سال ۱۹۸۶ اندازه‌گیری طول پرزها و مشاهده شکل آنها، شاهدی بر تعداد انتروسیت‌های پرز می‌باشد (هرچه طول پرزها بزرگتر باشد، دلیل وجود



References

- Bernardo, F. M., Machado, J. C. C. (1989) Prevalence of *Salmonella* in broiler carcasses in Portugal: epidemiological implication for man. Rev. Port. Cien. Vet. 84: 31-45.
- Hampson, D. J. (1986) Alteration in piglet small intestinal structure at weaning. Res. Vet. Sci. 40: 39-40.
- Hinton, M., and Linton, A. H. (1988) Control of *Salmonella* infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. Vet. Rec. 123: 416-421.
- Iji, P. A. Saki, A. and Tivey, D. R. (2001) Intestinal structure and function of broiler chickens on diet supplemented with a mannan oligosaccharide. J. Sci. Food Agric. 81: 1186-1192.
- Khan Nazer, A. H., Kazerani, K. R. (2001) Salmonellosis (*Salmonella typhimurium*) control in Poultry by Feed disinfection using formic acid. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 48: 19-37.
- Klasing, K. C. (1998) Comparative Avian Nutrition. CABI, International Publicatuon, New York, USA. pp. 9-35.
- Langhout, Ir. P. (2000) New additives for broiler chickens. World Poul. 16: 22-27.
- Moor, P. R., Evenson, A., Lucky, T. D., Hart, E. B. (1946) Use of sulfasuxidine, stretothricin and streptomycin in nutritional studies with chick. J. Biol. Chem. 165: 437-441.
- Pourhasan, H., Rahimi, Sh., Karimi Torshiz, M. A., Zahraei Salehi, T. (2008) Effect of organic acids on intestinal microflora and morphology of broiler chicks. J. Vet. Res. 63: 283-290.
- Singleton, P. (1999) Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. (5th ed.) John Wiley, UK. pp. 376-377.
- Teshfam, M., Rahimi, Sh., Karimi, K. (2005) Effect of various levels of Probiotic on morphology of intestinal muscosa in broiler chicks. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 60: 205-211.
- Van Leeuwen, P., Mouwen, J. M., Vanderklis, J. D., Verstegen, M. W. (2004) Morphology of the small intestinal mucosal of broilers in relation to age, diet formulation, small intestinal microflora and performance. Brit. Poult. Sci. 45: 41-48.

اسیدفرمیک جهت کاهش سالمونلا در خوراک استفاده شد (۵). در غلظت ۰/۲۵ درصد آن، آلودگی خوراک تا روز پنجم ادامه داشت. تأثیر ضد میکروبی بالای فورمایسین نسبت به سالکیل به خاطر آن است که فورمایسین علاوه بر اسید پروپیونیک و نمک‌های آن، حاوی فرمالدئید نیز می‌باشد که با توجه به فعالیت بالای ضد میکروبی فرمالدئید، فورمایسین توانسته است در مدت کمتری سالمونلای خوراک را از بین ببرد. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول‌های فوق، گاز فرمالدئید تأثیر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به سالکیل داشته است. با توجه ماهیت رها شدن تدریجی ترکیبات فعال از سالکیل کمتر بودن کارایی ضد سالمونلایی آن در خوراک قابل درک است. از مقایسه دو جدول فوق چنین برمی‌آید که افزودن ماده ضد عفونی در ابتدا به خوراک مؤثرتر از افزودن آنها بعد از آلودگی خوراک می‌باشد. با توجه به تأثیر فورمایسین در بهبود وزن گیری طیور و عدم تأثیر سوء بر سلامت آنها، می‌توان استفاده از این افزودنی را در شرایط بکار رفته در این تحقیق توصیه نمود.



EFFECT OF ORGANIC ACIDS AND FORMALDEHYDE ON MORPHOLOGY OF BROILER INTESTINE AND SALMONELLA REDUCTION IN FEED

Qadyanloo, B., Rahimi, Sh. *, Karimi Torshizi, M. A.

Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran-Iran.

(Received 24 October 2006 , Accepted 27 September 2007)

Abstract:

Control of poultry feed microbial contamination could reduce carcass contamination at processing plants and result in improvement of public health. In this study the effects of commercial blend of organic acids (Salkil® and Formycine®), formalin 37% and formaldehyde gas on morphology of intestinal mucosa and gut microflora in broilers were investigated. Three hundreds 1-d-old chicks (Ross 308) were randomly assigned to 5 groups with 4 replications of 15 birds. The first group was control and fed basal diet without supplemental of additives. The groups 2 to 5 fed diets treated by: 0. 2% Salkil, 0. 2% formalin, 0. 1% Formycine and formaldehyde gas throughout the experiment(d42). Among the experimental groups, formaldehyde destroyed *Salmonella enteritidis* of feed in short time. Number of tongue and leaf shape villi ($p<0.01$) at the age of 28 days, ridge shape ($p<0.05$) at the ages of 14 and 42 days and number of villi per view field at the ages of 28 ($p<0.01$) and 42 ($p<0.05$) days were provided some visible evidence from the effect of diet regiment. Treatments had significant effects on the villus height ($p<0.01$) at the age of 14 days, depth of the crypts ($p<0.05$) and height/width ratio of the villus ($p<0.05$) at the age of 28 days. Villus height of chickens that received Formycine was also longer than other experimental groups through out the study.

Key words: broiler, organic acids, formaldehyde, feed, *Salmonella enteritidis*.

*Corresponding author's email: rahimi_s@modares. ac. ir, Tel: 021-44580500, Fax: 021-44196524

